

# 新規核酸医薬品・ペプチド医薬品の進化法による探索

山本利香<sup>1,3</sup>・藤田聡史<sup>2,3</sup>・P.K.R.クマール<sup>3</sup>  
多比良和誠<sup>1,3</sup>

筑波大学 応用生物化学系<sup>1</sup>、筑波大学 物質工学系<sup>2</sup>、  
工業技術院、生命工学工業技術研究所、産業技術融合領域研究所<sup>3</sup>

機能核酸や機能ペプチドを分子進化法により実験室内で探索する手法が開発されている。核酸についてはすでに探索法が確立され、この手法を用いてHIVの転写を阻害する新機能RNAも創製された。この新規の核酸はHIVのTatタンパク質（転写活性化因子）に高いアフィニティで結合し、副作用の低い抗HIV剤としての利用が期待される。ペプチドにおいてはまだ際だった探索法が確立されておらず、現在ペプチド医薬品開発につながる様々な機能ペプチドの探索法が提案されつつある。



実験室内進化法, HIV, アプタマー

## はじめに

核酸は長らくタンパク質の鋳型にすぎないと信じられてきたが、近年、酵素活性を持つ核酸（リボザイム、DNAザイム）や特定の分子に結合する核酸（アプタマー）等の機能を持つ分子が発見され注目を集めている。また、ペプチドにもペプチドザイムなど機能分子の存在が確認されている。さらにアデノウイルスベク

ターを用いた人体への遺伝子導入法が開発され、これらの分子の治療薬としての利用価値が急激に高まった。つまり、人体に導入したベクターから医薬としての機能をもった核酸やペプチドを発現させることが可能となるからである。よって新規機能核酸やペプチドの開発は医薬品開発に非常に意義深い。しかし、自然界より新規医薬品のベースとなる化合物を探し出すのは非常に困難である。そこで機能核酸や機能ペプチドを実験室内で探

Rika Yamamoto<sup>1,3</sup>, Satoshi Fujita<sup>2,3</sup>,  
P. K. R. Kumar<sup>3</sup>, Kazunari Taira<sup>1,3</sup>  
Institute of Applied Biochemistry,  
University of Tsukuba<sup>1</sup>  
Institute of Material Science,  
University of Tsukuba<sup>2</sup>  
National Institute of Bioscience and Human  
Technology, National Institute for Advanced  
Interdisciplinary Research, AIST<sup>3</sup>  
E-mail : taira@nibh.go.jp  
Selection *In vitro* of novel medicines from  
random nucleic acids and peptides

索する手法が開発された。この手法で得られた HIV の転写を阻害する新機能 RNA は HIV の Tat タンパク質に高いアフィニティで結合し、副作用の低い抗 HIV 剤としての利用が期待される。

本稿では、分子進化法を用いた機能核酸や機能ペプチドを探索する手法およびそれによって創製された HIV の転写を阻害する新機能 RNA について紹介する。

## I. 核酸医薬品の開発

### 1. 医薬品としての核酸の適性

核酸は4種類の塩基から構成されているため、塩基配列の長さに依存して膨大な数の多様性を持つことができる（例えば100塩基ならば $4^{100} \approx 10^{60}$ 種類）。このことから、核酸は様々な情報を持つことが可能であり、また核酸自身が3次構造をとって機能を持つことも可能である。現在開発されている合成化学物質と比べて、核酸は通常人体に存在するものであるから、その核酸がターゲットに対して十分に高い特異性を持っていれば細胞への悪影響は低い。この“高い特異性”は核酸の多様性から得ることができる。また、生体内では核酸はその分解酵素によって分解され、長い間体内にとどまることはないため副作用の低さも推測できる。従って、核酸は医薬品として大変優れているといえる。ただし、これは逆に考えれば核酸医薬品の生体内での安定性の悪さでもある。核酸を医薬品として用いるためには、副作用がでない程度に化学修飾や構造の改変などをして、ある程度安定性を増す必要がある。

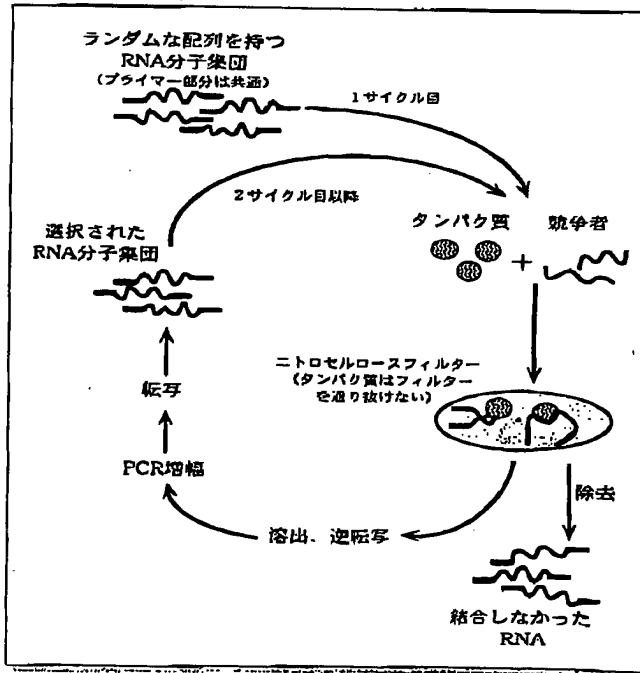
### 2. 実験室内進化法

先程述べたように核酸は膨大な多様性を持ち得るため、様々なリガンドに結合させたり、触媒機能を持たせることも可能であるのではないかと考えられた。これを受けて、新しい機能を持つ核酸の探索法として実験室内（試験管内）進化法（*in vitro* selection, SELEX）が考案された。この方法は1990年頃、同時期に複数の研究室から相次いで発表され注目を浴びたり。その結果、一本鎖 RNA を切断する RNA 酵素（リボザイム）や、有機色素に結合する RNA 分子、トロンビンに結合し阻害剤として働く DNA 分子など、様々な機能核酸が創製された。ある機能（タンパク結合能や酵素としての触媒能など）を持つ分子の選択（要らない分子の淘汰）と増幅を繰り返し行うことで、目的の機能を高い活性で持つ分子を選び出すことができる、きわめて単純だが優れた方法である。ただし、この操作は全て試験管内で行うため医薬品に用いた場合に活性が必ずしも保持されるとは限らず、改善が必要な場合がある。

実際の操作は簡単で、図①に示すように、われわれが用い

た方法は次のようなものである。①まずはじめにランダムな配列を持つ RNA の分子集団を合成する。②この中から目的の活性を持つ（例えば目的のタンパク質と結合する）RNA を大まかに選び出す。③これを逆転写し、PCR で増幅して、転写する。④いくらか活性を持つ RNA 分子集団が得られるので、この分子集団を用いて、②からの操作を再び行う。このサイクルを条件を厳しくしながら（タンパク質の濃度を下げる、結合の際に競争者となる様な RNA を加える等）何回か繰り返す事によって、徐々に高い活性を持つ RNA 分子集団が得られる。はじめの分子集団がカバーできる多様性は $10^{14}$

図① 実験室内進化法

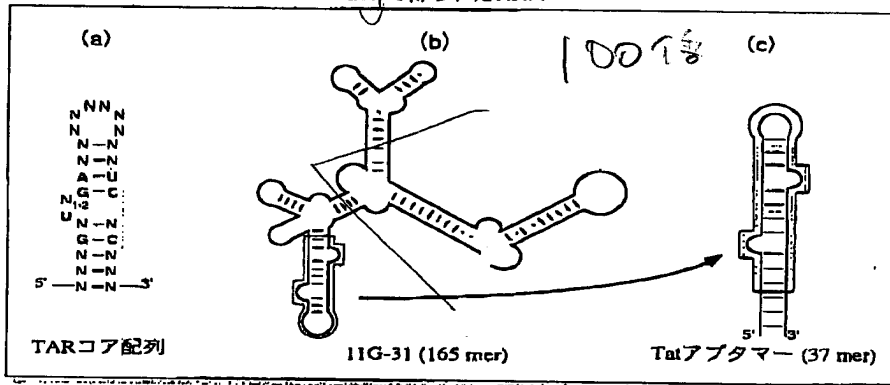


オーダーであるため、目的の核酸は大抵得ることが可能だが、さらに多様性を増すために、PCRの際にその条件を工夫して変異を誘導することもできる<sup>9)</sup>。いわば実験室で人工の進化を行っているのである。われわれはこの方法を用いてHIV-1（ヒト免疫不全ウイルス1型）のTatタンパク質に対するRNAリガンド（Tatアプタマー）を探し出す事に成功した。

### 3. HIVのTatタンパク質

ヒト免疫不全ウイルス（HIV）はプロウイルス（宿主細胞の染色体上にウイルスの遺伝子がDNAの形で乗っている状態）からの転写の際に、あるタンパク質の存在によって爆発的に増幅する。この大変重要な役割を果たすタンパク質はtrans-activating protein (Tat) と呼ばれるもので、HIVのLTRからの初期転写産物上にあるTAR(trans-activating response region) というステム・ループ構造をとる領域に特異的に結合し、TAR領域で留まってしまっている転写を活性化してその先の転写を促す<sup>10,11)</sup>。Tatタンパク質が存在する時としない時での発現量の差は100倍から1000倍とも言われている<sup>12)</sup>。さらに、転写以外に逆転写にもTatタンパク質が重要な役割を果たしているという報告もなされている<sup>13)</sup>。従って、このタンパク質の働きを阻害すれば、逆転写酵素やプロテアーゼを阻害するよりも効率よくウイルスの増幅を抑制できる可能性がある。また、現在知られている抗ウイルス剤の欠点は、すぐにその薬剤に対する耐性を持つウイルスが出現することであるが、このTatタンパク質の保存領

図2 TARコア配列と *in vitro* selection で得られたRNA



域はウイルスに必須で変異が起こりにくい部位であるため、耐性ウイルスの出現も起こりにくいと考えられる。

### 4. TatアプタマーとTAR RNAのTatタンパク質に対するアフィニティの比較

実験室内進化法で得たRNA分子集団のうちのいくつかの配列を無作為に調べたところ、約40%のRNA分子は、TAR RNAがTatタンパク質に結合するのに必要な保存配列（TARコア配列、図2-a）を含んでいた。さらに興味深いことに、そのRNA分子のなかから、TARコア配列を隣り合わせに二つ持つものが見つかった（図2-b）。それぞれのRNA分子の結合能を調べた結果、TARコア配列を二つ含んだステム・ループを持つRNA分子の結合能が最も高かったため、このRNA分子のステム・ループ構造の部分のみを化学合成し、Tatアプタマーと名付けた（図2-c）。このTatアプタマーはTAR RNAと比較して、大変低い濃度で高い結合能を示した。また、同様にゲルシフト法を用いて、直接TAR RNAと

TatアプタマーのTatタンパク質に対するアフィニティを比較した結果、われわれのアプタマーはTAR RNAの約100倍のアフィニティを示した<sup>14)</sup>。

### 5. TatアプタマーのHIV-2（ヒト免疫不全ウイルス2型）への応用

先進国ではその数は少ないが、主に西アフリカで流行しているHIV-2に対しても、その治療法は確立されていない。HIV-2の持つTatタンパク質とTAR領域は、HIV-1のそれとはあまり似ていないが、Tatタンパク質の中のTARとの相互作用に必要なアルギニンリッチな部位はある程度保存され、またTAR領域に存在するTARコア配列を共通して持っている<sup>15,16)</sup>。そこで、われわれのTatアプタマーがHIV-2のTatタンパク質に対してどのような性質を持つかを調べた。その結果、TatアプタマーはHIV-2のTat由来のペプチドに対しても、HIV-2 TARの約50倍のアフィニティを持っていた。従って、われわれのTatアプタマーはHIV-2にも応用できる可能性があること

が示された。

## 6. Tatアプタマーの副作用の有無

Tatタンパク質による転写の促進の際に、TAR領域には宿主細胞の転写因子（ポリメラーゼII、TRP-185等）が結合することがわかっている<sup>14,15</sup>。Tat/TARの相互作用とは無関係なHIV以外のプロモーターからの転写を、TAR RNAが阻害することも示されている<sup>16</sup>。このことは、TAR RNAをTatタンパク質の阻害剤として用いる際に、副作用としてTAR RNAがハウスキーピング遺伝子の転写など、ウイルス以外の転写にも無差別に影響してしまう可能性を示唆している。しかし、HeLa細胞の核抽出物において、前述したTatアプタマーの存在下でHIV以外のプロモーターからの転写を行ったところ転写阻害は見られなかった。

以上のことから、われわれのアプタマーはTatタンパク質の働きを特異的に阻害してウイルスの増幅を抑制する医薬品として、大変有望であることがわかった。また、このアプタマーのTatタンパク質に対するアフィニティの高さは今まで知られているどのタンパク質・核酸の相互作用よりも強いので、他の応用も期待される。本稿のセクションIIでは機能ペプチド探索のツールとして用いた例を紹介する。

## II. ペプチド医薬品の開発

### 1. 医薬品としてのペプチドの適性

ペプチドやタンパク質はアミノ酸20種類の組み合わせで構成されるため、4種類のヌクレオチドの組み合わせで構成

される核酸に比べ、より複雑で多様な構造をとることができる。このことは生体内で作用する酵素や抗体、様々な機能分子の多くがタンパク質で構成されていることから明らかである。またペプチドは核酸同様、体内に恒久的に存在する物質であり、人体にとって化学的毒性の少ない物質であるといえる。よって、ターゲットに対する特異性を十分に確保できれば、ペプチドやタンパク質は核酸と同様に副作用のない優れた医薬品となりうる。しかし、実際は、核酸においてアプタマーやリボザイム、アンチセンスに代表される様々な新機能分子が造られ、医薬品としての応用が進められているのとは対照的に、新機能ペプチドの進化法による創出はほとんどない。その第一の理由は、本稿のセクションIで述べたように核酸には確立された機能核酸探索法があるのに対し、ペプチドには優れた探索法がいまだ確立されていない点にある。よって現在、ペプチド医薬品の進化法による探索を行うための、優れた手法「ペプチドの実験室内進化法」の開発が望まれている。

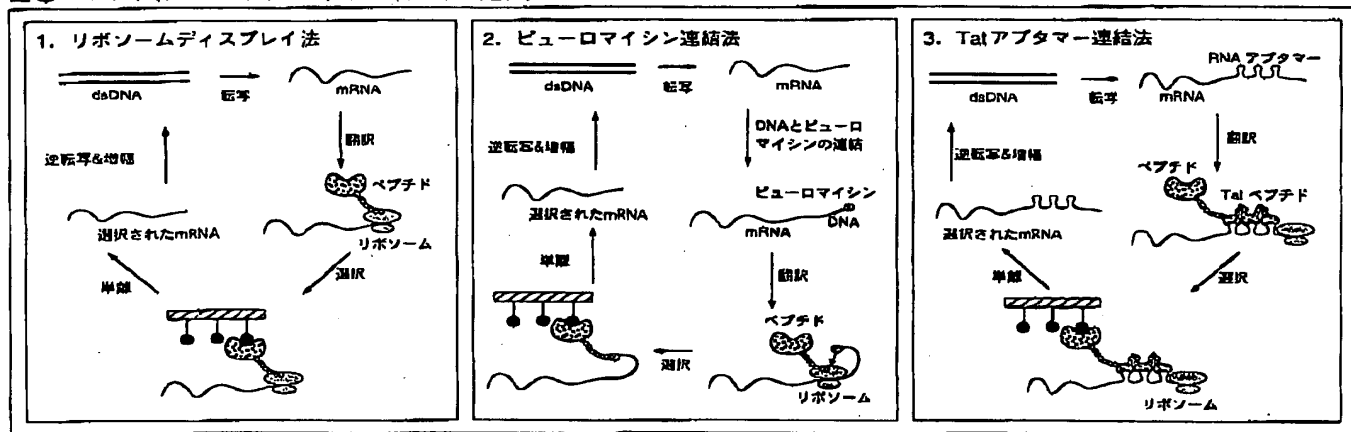
### 2. ペプチドの実験室内進化法

ペプチド進化法の開発の大きな妨げとなっているのは、翻訳されたタンパク質のコードする配列を読み取る事が核酸に比べ非常に難しいという点にある。この問題を解決するために、これまで提案されているペプチド進化法では、①DNAを転写、翻訳し、その結果、つくられたタンパク質を同一の情報をコードした核酸と物理的に結合させた状態でタンパクの選択を行い、②共に選択された核酸を

PCR法により増幅し、その配列を調べる事で選択されたタンパク質の情報を知らうとしている。これまでにファージディスプレイ法、プラスミッドディスプレイ法、選択を完全に*in vivo*（生体内）で行う手法などが報告されている<sup>17-21</sup>。しかし、これらの手法ではすべて大腸菌などの菌体を核酸とタンパク質の結合の仲介として用いるため、タンパク分子の多様性が限られ、例えばファージディスプレイ法では10<sup>8</sup>程度である。機能を持つタンパク質を効率よく探索するためには、より多様なタンパク質のライブラリーが必要である。

近年、リボソームやビューロマイシンを仲介としてペプチドとRNAを連結する手法（以後「リボソームディスプレイ法」および「ビューロマイシン連結法」と記す）が発表された<sup>22-24</sup>。これらは核酸の実験室内進化法と類似したサイクルをペプチドに対して行うものである。まず、DNAのランダムライブラリーを用意し、これを鋳型にして試験管内で転写、翻訳する。リボソームディスプレイ法（図③-1）ではmRNAにわざと終止コドンを導入しないことで、翻訳の際リボソームがmRNA、アミノアシルtRNA、ペプチド等と複合体を形成し、ペプチドがmRNAから解離しないようにする。この複合体中間体は極めて不安定であるので、マグネシウムなどで安定化させたうえ、複合体のままペプチドを選択する。選択された複合体からmRNAを分離し逆転写、増幅する。このサイクルを数回繰り返すことで活性を持つペプチド集団が増幅される。ビューロマイシンにより

図3 ペプチド(タンパク質)の試験管内(in vitro)進化法



ペプチドとRNAを連結する手法(図3-2)もこのリボソームディスプレイ法と似てはいるが、翻訳の際、mRNAの末端にビューロマイシンを連結しておき、ペプチドとmRNAを共有結合で確実に連結させようとする点が異なる。ビューロマイシンの構造はアミノアシルtRNAと類似しており、タンパク質の合成過程にあるペプチジルtRNAと反応し、その結果mRNAとペプチドが連結される。これらの新しい手法と先に述べた手法との最大の相違点は、全行程を*in vitro* (試験管内)で行うことにあり、よって、ライブラリーの多様性を $10^{12}$ 以上に拡大することが可能となった。しかし、これらの方法にもそれぞれ欠点がある。リボソームディスプレイ法では複合体の安定性の維持が難しいことが最大の欠点であり、ビューロマイシンによる連結法も各サイクルにおいてビューロマイシンをmRNAに付加するという合成のステップが入るため技術的な難しさが残る。

### 3. TatとTatアプタマーの相互作用を用いたペプチドの試験管内進化法

現在、われわれは新たなペプチドの試験管内進化法の開発を試みている。Tatタンパク質と高いアフィニティで結合するTatアプタマーを探し出した事は前述した。われわれの手法では、Tatの結合ドメイン部分のペプチド(Tatペプチド)とTatアプタマーをmRNAとペプチドの連結の仲介として用いている。この手法の最大の利点は、①連結に用いるツールがすべて純粋にRNAもしくはタンパク質であるため、サイクルに合成のステップが入らない事、②mRNAとペプチドがTatペプチドとRNA(Tat)アプタマーを介し、直接的に連結される事にある。ただ、ビューロマイシンを用いた手法のように共有結合で連結されるわけではないので、その結合アフィニティを解離が起らないレベルまで引き上げることがこの手法の成功の鍵となる。そこで、われわれはTatペプチドおよびTatアプタ

マーをタンデムに複数個連結させることでmRNAとペプチドをより強く結合させようと試みた(図3-3)。複数の結合ドメインを連結することでアフィニティが高まるという報告は筆者の知る限り数例あり、また自然界でも結合をより確実にするため複数の結合ドメインを持つ機能分子も少なくない<sup>28,29,30</sup>。この新たな試験管内進化法は、リボソームディスプレイ法やビューロマイシン連結法と同様、転写→翻訳→選択→逆転写→増幅のサイクルを繰り返すことで様々な種類のペプチド分子から機能分子を選択する。選択の対象となるペプチドとTatペプチド(複数)およびTatアプタマー(複数)をコードしたmRNAを二本鎖DNAを鋳型として試験管内で転写し、翻訳する。するとTatアプタマーを含むmRNAと融合ペプチドのTatペプチドが速やかに結合し、ペプチドとそれをコードするmRNAの複合体が形成される。この複合体に対して、選択を行うことで機能を

持つペプチドが選ばれ、その情報は mRNA を逆転写し、PCR で増幅することで行われるのである。

## おわりに

進化法により様々なタイプの機能核酸が創製されているが、これらを実際に人体に対して医薬品として用いるには安定性の確保、発現量の制御、導入に用いるベクターの安全性等、様々な問題が山積みである。機能ペプチドの創製にいたってはまだ手法の開発段階で優れた探索法の開発が望まれる。

## 参考文献

- 1) Robertson DL, Joyce GF: Nature, 344, 467-468, 1990.
- 2) Ellington AD, Szostak JW: Nature, 346, 818-822, 1990.
- 3) Tuerk C, Gold L: Science, 249, 505-510, 1990.
- 4) Osborne SE, Ellington AD: Chem. Rev, 97, 349-370, 1997.
- 5) Bock LC, et al.: Nature, 355, 564-566, 1992.
- 6) Leung DW, et al.: J. Methods in Cell and Mol Biol, 1, 11-15, 1989.
- 7) Cullen BR: Cell, 46, 973-982, 1986.
- 8) Peterline BM, et al.: Proc Natl Acad Sci USA, 83, 9734-9738, 1986.
- 9) Rice AP, Mathews MB: Nature, 332, 551-553, 1988.
- 10) Hauber J, Cullen BR: J Virol, 62, 673-679, 1988.
- 11) Harrich D, et al.: J Virol, 70, 4017-4027, 1996.
- 12) Yamamoto R, et al.: Gene Ther Mol Biol, 1, 451-466, 1998.
- 13) Emerman M, et al.: EMBO J, 6, 3755-3760, 1987.
- 14) Elangovan B, et al.: J Virol, 66, 2031-2036, 1992.
- 15) Rhim H, Rice AP: J Virol, 67, 1110-1121, 1993.
- 16) Shelton CT, et al.: Genes Dev, 5, 2508-2520, 1991.
- 17) Wu F, et al.: Genes Dev, 5, 2128-2140, 1991.
- 18) Yamamoto R, et al.: Nucleic Acids Res, 25, 3445-3450, 1997.
- 19) Smith GP: Science, 228, 1315-1317, 1985.
- 20) Schatz PJ, et al.: Methods Enzymol, 267, 171-191, 1996.
- 21) Zhang J-H, et al.: Proc Natl Acad Sci USA, 94, 4504-4509, 1997.
- 22) Moore JC, Arnold FH: Nat. Biotechnol, 14, 458-467, 1996.
- 23) Harada K, et al.: Nature, 380, 175-179, 1996.
- 24) Roberts RW, Szostak JW: Proc Natl Acad Sci USA, 94, 12297-12302, 1997.
- 25) Nemoto N, et al.: FEBS Lett, 414, 405-408, 1997.
- 26) Matheakis LC, et al.: Proc Natl Acad Sci USA, 91, 9022-9026, 1994.
- 27) Hanes J, Plukthun A: Proc Natl Acad Sci USA, 94, 4937-4942, 1997.
- 28) Shuker SB, et al.: Science, 274, 1531-1534, 1996.
- 29) Zheng G, et al.: J Biol Chem, 272, 31855-31864, 1997.
- 30) Inoue M, et al.: J Mol Biol, 272, 82-94, 1997.